

## Szénhidrát meghatározási módszerek összehasonlítása és az antronos eljárás alkalmazása szőlővessző cukor és keményítő- tartalmának sorozatvizsgálatára

PÁNCZÉL MÁRTA és EIFERT JÓZSEF

*Szőlészeti Kísérleti Laboratórium, Állami Gazdaság,  
Balatonboglár*

A szőlő fajtafenntartó szaporításának egyetlen módja: a vegetatív szaporítás. Erre a célra az esetek többségében a tőke egyéves, tökéletesen elfásodott szárát, a vesszőt használjuk. Már régi az a tapasztalat, amit a szakirodalom is csak megerősített, hogy az eredményes szaporítás és hosszúéletű tőke alapja az „érett vessző”. Ennek az állapotnak különböző fokozatai vannak, melyeket anatómiai — (szín, diafragma, fa- és bélszövet arány, szilárdság stb.), kémiai — (raktározott anyagcsere termékek mennyisége és minősége), továbbá fiziológiai bélyegek jellemeznek (OSZTROVSZKYNÉ [12], WINKLER [22], KÖVESSY [8], ZIMMERMANN [27]).

A vessződarab a raktározott tápanyagok mozgósításával válik új egyedkévé, ha gyökérzetet és hajtásrendszert képez. Az új szervek fejlettsége, így az új egyed várható életképessége, a felhalmozott energiaforrás (szénhidrát, fehérje) mennyiségével összefüggésben van. Érthető, hogy a vesszőéretttség megállapításához elsősorban a szénhidrátok mennyiségét már korábban többen vizsgálták (BERNSTEIN [2], KOZMA [7], STOEY [18], WINKLER [23, 25]). A nyugalmi állapotban levő vessző a szénhidrátok tekintélyes részét a fatest faparenchima-, farost- és bélsugársejtjeiben keményítő és cukor formájában raktározza (WINKLER [25]).

### Az eddig alkalmazott módszerek kritikai értékelése

A kutatók elsősorban a szőlő fiatal zöld és az elfásodott egyéves vagy több éves szárának cukor és keményítő tartalmát vizsgálták. Az idevonatkozó irodalmi adatok nagyfokú szórását STOEY [18] döntően módszerbeli hibának tulajdonítja. Véleményünk szerint is, valamennyi eddig alkalmazott módszer, munkaigényessége mellett még számos hibaforrást is rejt magában. Mindegyik módszer megegyezik abban, hogy a növényi részt 65—80 °C-on kell kiszáritani és finom őrléménnyé aprítani. A szemcsefinomságot egyedül STOEY [18] adja meg 0,25 mm-es átmérővel.

A cukrok kioldását legtöbb módszer szerint hideg vagy meleg etilalkohollal végzik. Ily módon a polifenolok is kioldódnak, melyek redukáló tulajdonságuknál fogva zavarhatnak. A legnagyobb nehézséget a keményítő kivonása és hidrolízise jelenti. A sósavas hidrolízist autoklávban (OSZTROVSZKYNÉ [12]), vagy forró vízfürdőn, (KOZMA [7], VUK és SÁNDOR [21]) oldják meg. Enzimes hidrolízist PERLUSZ és MOLNÁR [16], POPOFF [17] és STOEY [18] alkalmaznak.

A sósavas feltárás előnye az, hogy még a tökéletlen őrlés esetében is biztosan ki tudja szabadítani a keményítőszemecskéket a vastagfalú rekeszfárosatok belsejéből. Hátránya azonban, hogy a keményítón kívül a hemicellulózt is hidrolizálja (NIKITIN [11]). A hemicellulóz jelenlétét a szőlővesszőben AFRIKJAN [1] és WINKLER [24] vizsgálatai igazolták. Ennek tulajdoníthatók az irodalomból ismert sokszor indokolatlanul magas keményítőértékek.

Az enzimes feltárással a sósavas hidrolízis hibáit elvileg kiküszöbölhetjük, ha maláta diasztázzal (STOEY [18]), nyál-amilázzal (PERLUSZ és MOLNÁR [16]), vagy pedig diasztáz készítménnyel dolgozunk. Ennek az eljárásnak használhatóságát nagyon megnehezíti egyrészt hosszadalmassága, másrészt az enzim preparátumok sokszor megmagyarázhatatlan megbízhatatlansága (PAECH és TRACEY [13]). Tapasztalataink szerint, ha őrléssel a fárosatok sejt szerkezetét megszüntetni nem tudtuk, az enzimes feltárás nem volt tökéletes (mikroszkóp alatt jódos-káliumjodidra keményítőpozitív sejteket találtunk).

A redukáló cukrokká hidrolizált keményítőt eddig csaknem valamennyi kutató a klasszikus Bertrand- vagy Hagedorn—Jensen-féle módszer eredeti vagy módosított eljárásával határozta meg (POPOFF [17]).

Újabban a külföldi és hazai irodalomban egyre többször találkozunk cukrok, növényi cukrok és keményítő antronnal történő meghatározásával (CLEGG [3], DREYWOOD [4], FELFÖLDY [5], FÖLDES [6], MÁRKUSNÉ [9,10], YEMM és WILLIS [26]). Az eljárás lényege, hogy a növényi részekből forró etilalkohollal kioldott cukrokat és a perklórsavval kioldott keményítőt külön-külön, 95%-os kénsavban oldott antronnal reagáltatjuk. Közben a hidrolízist a kénsav elvégzi. A szénhidrátok kénsavas közegben vízelvonás mellett furánaldehid származékká alakulnak, és azok, antronnal kondenzálva 450—620 m $\mu$  közti maximummal színes terméket képeznek. A reakció igen érzékeny, pl. keményítőre nézve 40-szer érzékenyebb, mint a jóde reakció. A szín értéke Pulfrich fotométeren S 61 színszűrővel jól mérhető. A módszer előnye, hogy érzékeny, pontos és viszonylag gyors (MÁRKUSNÉ [9]).

### Szokásos vizsgálati módszerek kísérleti összehasonlítása

Módszerkeresési vizsgálataink során az a célkitűzés vezetett bennünket, hogy a szőlő elfásodott vesszőjének cukor- és keményítő tartalmát olyan módszerrel határozzuk meg, mellyel gyorsan és legpontosabban dolgozhatunk. Ezért az eddig leggyakrabban alkalmazott klasszikus módszereket összehasonlítottuk az általunk szőlőre is alkalmazhatónak vélt antronnal történő meghatározással.

Egymás mellett végeztük vizsgálatainkat *Riparia portalis* egyéves vesszőjéből készített egalizált mintán.

Az alábbi négyféle vizsgálati módszert hasonlítottuk össze párhuzamosan:

Az első módszer lényege a *keményítő sósavas hidrolízise* (BERNSTEIN [2], VUK és SÁNDOR [21]), ennél a cukrokat és keményítőt együttesen határozzuk meg a hidrolízis után Bertrand-féle titrálással.

A második módszer a *keményítő hidrolízisét diasztázzal* végzi, ezt megelőzően a cukrokat különválasztja. A cukrokat és a keményítő-hidrolizátumot Hagedorn—Jensen-féle módszer Popoff által módosított formájában határozzuk meg (POPOFF [17]).

A harmadik módszer szerint a keményítő feltárása sósavas alkohollal, kioldása forró vízzel, hidrolizálása pedig nyállal történik (PERLUSZ és MOLNÁR [16]). A cukrokat Bertrand-féle eljárással, a hidrolizált keményítőt pedig cerimetrikus titrálással határozzuk meg. E módszert pontosnak és részletesnek tartjuk, annál is inkább, mert ebben a polifenolok lecsapása is megtörténik. Éppen ezért ezt a módszert használtuk fel az általunk választott antronos eljárás adatainak kontrolálására. Hátránya a módszernek, hogy nagyon munkaigényes, amiért sorozatvizsgálatokra nekünk nem alkalmas.

A negyedik módszer az *antronos eljárás*, melyet CLEGG [3] vizsgálatai alapján szőlővesszőre úgy módosítottunk, hogy a cukor és keményítő meghatározása előtt a zavart okozó vegyületeket (polifenolokat, fehérjéket) ólomacetáttal kicsaptuk, PERLUSZ és MOLNÁR [16] szerint. Ezzel a módszerrel a vessző cukor és keményítő tartalmát glükóz értékben jól reprodukálható módon tudjuk mérni.

A négyféle vizsgálati módszer összehasonlító adatait az 1. táblázatban adjuk meg.

1. táblázat

Különböző módszerekkel történt meghatározások cukor- és keményítőértékei

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Párhuzamos minták jele	Módszer száma	Egyszerű cukrok	Nádcukor	Összes cukor	Keményítő	Összes redukáló képesség hidrolízis után
		%				
a	1					25,15
b						27,15
c						24,12
a	2	7,10			1,40	
b		7,20			1,54	
c		7,50			1,59	
a	3	7,60	2,27	9,87	4,25	
b		7,48	2,88	10,36	4,14	
c		7,58	2,96	10,54	4,20	
a	4			11,50	4,30	
b				11,40	4,38	
c				11,52	4,40	

Az 1. sz. módszer alkalmazásával kapott nagy, összes-redukáló képesség a cukrokon és keményítőn kívül a hemicellulózénak tulajdonítható.

A 2. sz. módszert a módszer hosszadalmassága miatt csak az egyszerű cukrok és keményítő adatainak összehasonlítására végeztük el. A vesszőmaradék a diasztázzal történő hidrolízis után mikroszkóp alatt káliumjodidos jóddal vizsgálva keményítőre pozitív volt. Megállapítottuk, hogy a hibát diasztáz preparátumunk elöregedése okozta, mely egy kontrollképpen beállított amylum-solubile p. a. minőségű preparátumot sem bontott el tökéletesen.



A 3. sz. módszer összes cukor- és keményítő adatai jól használhatók a 4. sz. módszer hasonló adatainak ellenőrzésére.

Adataink légszáraz anyagra vonatkoznak.

Hogy egyugyanazon törzsoldatnak a különféle módszerekkel történő meghatározása milyen eredményeket ad, erre a célra a 2. sz. módszer „a” jelzésű, egyszerű cukor törzsoldatát (2/a) vizsgáltuk meg, és elvégeztük a cukor meghatározását Hagedorn—Jensen, valamint Bertrand-féle titrálással és antronnal. A kapott eredményt a 2. táblázatban adjuk meg, mely 3—3 párhuzamos mérés eredményét mutatja.

2. táblázat

## Egyszerű-cukor tartalom %-ban

(1) Minta jele	(2) Hagedorn— Jensen szerint	(3) Bertrand szerint	(4) Antronnal
2/a	7,10	7,60	7,20
	7,18	7,56	7,28
	7,21	7,62	7,17

A 3. sz. módszer vizsgálatánál nyert keményítő törzsoldatban meghatároztuk a keményítő tartalmát még párhuzamosan antronnal és a jód-színleakció intenzitásának mérése alapján, PALOHEIMO [14, 15] szerint. A 3. táblázatban ismertetjük a 3 párhuzamos mérési eredményt.

3. táblázat

## Keményítő tartalom %-ban

(1) Párhuzamos minták jele	(2) Cerimetrikus titrálással	(3) Antronnal	(4) Jód-szín- intenzitás méréssel
a	4,25	4,48	4,24
b	4,14	4,87	4,40
c	4,20	4,62	4,64

A fenti táblázati adatok igazolják, hogy az antronos módszerrel történő szőlővessző szénhidrát meghatározás pontos, és a vesszőből származó esetleges kísérőanyagok a színkifejlődést nem zavarják.

## Az antronos meghatározási módszer ismertetése

## A minta előkészítése vizsgálatra

A 65 C°-on kiszáritott *Rip. port.* vesszőt 2—3 cm-es darabokra vágjuk. Medicago kalapácsos őrlővel megdaráljuk, majd egy finomabb Schiltknecht (Zürich) kalapácsos darálón 0,5 mm-es szitabetéten engedjük át. Ebben az őrleményben a sejtes szerkezet mikroszkóp alatt még megállapítható. Az ilyen minőségű őrlemény keményítő tartalma csak sósavval tárható fel tökéletesen.

Enzimes hidrolízis után mikroszkóp alatt a sejtekben jódpróbával még keményítő mutatható ki. Ez a finomságú őrlemény tehát céljainknak még nem felel meg. Ezért a sejtes szerkezet megszüntetésére az anyagot Bloch—Rosetti-féle porcelán golyós malomban kevés homokkal és etilalkohollal homogenizátummá dörzsöljük. *Csakis az ilyen módon őrlött vesszőanyag keményítője válik hozzáférhetővé az enzimek hidrolizáló vagy a perklórsav oldó hatása számára.*

#### Cukrok kivonása

A légszáraz vesszőőrlemény 0,5 g-ját azonos súlyú homokkal 5 ml 80%-os etilalkohollal 10 percig 490/sec fordulatszám mellett golyós malomban őrljük. A nyert pépet kvantitatíve 40 ml desztillált vízzel polietilén centrifugacsőbe mossuk. 20 percig 8000/sec fordulatszámon centrifugáljuk. Az alkoholos vizes folyadékot 200 ml-es mérőlombikba öntjük. A centrifugacsőben levő üledéket 5 ml forró 80%-os alkohollal üvegbot segítségével homogén péppé keverjük, majd 20 ml forró alkoholt adva hozzá 20 percig az előbbi módon centrifugáljuk. Ezt az alkoholos oldatot is az előbbi vizes alkoholos oldathoz öntjük. A kezelést és centrifugálást még kétszer, azonos módon megismételjük. Az így összegyűjtött oldatokat jelig desztillált vízzel feltöltjük. A kapott törzsoldatból 100 ml-t 200 ml-es mérőlombikba pipettázunk, 1 ml telített semleges ólomacetátot adunk hozzá, 5 pernyi várakozási idő után, desztillált vízzel jelig töltjük. 10 perc múlva szűrjük, a szűrletből 100 ml-t újabb 200 ml-es mérőlombikba pipettázunk és 1 ml telített dinátriumhidrofoszfáttal az ólom feleslegét közömbösítjük. 5 perc múlva jelig töltjük. Az így nyert oldatból alapos összerázás után kb. 40 ml-t lecentrifugálunk, s a teljesen tiszta átlátszó oldatnak 1 ml-jét antronozzuk.

A polifenolok lecsapásával, a lecsapószer közömbösítésével együttjáró műveletek közben a cukor kivonásához használt alkohol koncentrációja is annyira meghígul, hogy az az antron reakciónál már nem zavar. Célszerű a hígításokat a várható cukormennyiségnek megfelelően úgy választani, hogy az antronozásra kerülő 1 ml vizsgálandó oldat 50—100  $\mu$ g glükóz tartalmú legyen.

#### Keményítő kivonása

A cukrok kivonása után a centrifugacsőben visszamaradt vesszőpépet 5 ml desztillált vízzel homogén masszává keverjük, majd 6,5 ml 52%-os perklórsavat ( $\text{HClO}_4$ ) cseppenként keverünk hozzá. Utána 15 percig állandóan keverjük. Keverés után 20 ml desztillált vizet teszünk hozzá, és 20 percig centrifugáljuk. A folyadékot megfelelő nagyságú (esetünkben 500 ml-es) mérőlombikba öntjük, és a vizes perklórsavas kezelést és centrifugálást még egyszer megismételjük. Az összegyűjtött oldatokat desztillált vízzel jelig töltjük. A mérőlombik méretét a várható keményítő mennyiségének megfelelően úgy választjuk meg, hogy a törzsoldat 1 ml-je 50—100  $\mu$ g glükóz értékű legyen.

A kivonatok jégsekrényben 4—5 napig eltartathatók.

Az így készült cukor és keményítő törzsoldatok 1—1 ml-jét 3—3 szoros ismétlésben antronozzuk.

*Az antron reagens elkészítése:* 200 ml-es mérőlombikban feloldunk 0,4 g antront (KETI készítmény, B. D. H. vizsg. szerint) p. a. minőségű 95%-os kénsavban. A reagenst felhasználása előtt 4 órával mindig frissen készítetjük.

*Glükóz standard készítése:* 0,1 g glükózt 1000 ml-es mérőlombikban desztillált vízzel oldunk, majd jelig töltve az így készített törzsoldatnak 25 ml-jét 50 ml-es mérőlombikban tovább hígítjuk. Az így nyert oldat 1 ml-je 50  $\mu$ g glükóz tartalmú. A glükóz standardot mindig frissen készítetjük. Az 50  $\mu$ g glükóz standardra azért volt szükségünk, hogy az ezzel történő közvetlen összehasonlítással — CLEGG [3] vizsgálataihoz hasonlóan, — mindenkor le tudjuk ellenőrizni, hogy a vizsgálandó anyagban, a módszerben vagy reagensben nem léptek-e fel zavaró körülmények?

*A kivonatok elemzése CLEGG [3] szerint*

15  $\times$  165 mm-es csiszolt dugós bórszilikát kémcsövekbe pipettáztuk a következő módon összeállított oldatokat:

(I.) „Kontrol”-t, mely 2 ml vizet tartalmaz;

(II.) „Standard glükóz”-t, mely 1 ml vizet és 1 ml 50  $\mu$ g glükóz oldatot tartalmaz;

(III.) „Test-kivonat”-ot, mely 1 ml hígított kivonatot és 1 ml vizet tartalmaz;

(IV.) „Standard glükózzal dúsított test-kivonat”-ot mely 1 ml hígított kivonatot és 1 ml (50  $\mu$ g) standard glükóz-oldatot tartalmaz.

Az (I.)-et egyszeres, a (II.), (III.), (IV.) jelzésű oldatokat három párhuzamossal vizsgáltuk.

Minden kémcsőbe 4 ml 0,2%-os antron reagenst csepegtettünk jégkockás vízfürdőben történő hűtés közben. Ezután csiszolt dugóval bedugva felfordítással óvatosan összeráztuk. Egy-egy elemzési sorozatban maximum 40 kémcsővel dolgoztunk. A kémcsöveket forrásban levő vízfürdőben 10 percig hevítettük (közben a csiszolt dugókat enyhén meglazítottuk), és a hevítés befejezése után folyó csapvízben 15 percig hűtöttük. Az eközben kifejlődött zöldszín intenzitását Pulfrich fotométeren „S 61” színszűrővel 1 cm, ill. 0,5 cm rétegvastagságú küvetában 1 órán belül mértük.

*A számítás menete:*

Ha zavaró körülmény nem áll fenn, akkor a „standard glükózzal dúsított testkivonat” extinkciós értékéből (IV) kivonva a „standard-glükóz” (II.) extinkciós értékét, meg kell kapnunk a „testkivonat” (III.) extinkciós átlagértékét. Ha vizsgálatunk így megnyugtatóan helyesnek bizonyult, akkor a II., a III. extinkciós értékek és a hígítások figyelembevételével könnyen kiszámíthatjuk a vizsgált „testkivonat” (III.) glükóz értékét. Ha rendszeresen fellépne zavaró körülmény, akkor a IV—III különbség értékét kell 50  $\mu$ g extinkciójának tekinteni, és a számítást erre kell vonatkoztatni. (CLEGG). Esetünkben pl. 50  $\mu$ g glükóznak (II.) 0,429, a III. testkivonatnak 0,227 az extinkciós átlagértéke, ami 26,5  $\mu$ g glükóznak felel meg. A hígítások figyelembevételével 0,5 g légszáraz vesszőből kiindulva, amennyiben cukor-testkivonatról van szó, úgy ezt a 26,5 értéket 0,16-al (4,24%); keményítőtestkivonat esetében pedig 0,1-el (2,65%) szorozzuk, hogy a vizsgált légszáraz vessző cukor vagy keményítő tartalmát %-os glükóz értékben kapjuk meg. Ha keményítő tartalmat nem %-os glükózértékben, hanem keményítő %-ban kívánjuk kifejezni, úgy azt (2,65%) még 0,9 konverziós faktorról beszorozzuk (2,39%).



### A kivonatok elemzése standard görbe alapján

Miután megállapítottuk, hogy az elfásodott vesszőben semmi olyan zavaró anyag nem áll fenn, amelyet az ólomacetátos kicsapással el ne távolíthatnánk, feleslegessé vált a CLEGG szerinti „standard glükózzal” dúsított meghatározási módszer. Ezekután már a lényegesen egyszerűbb és gyorsabb glükóz standard görbe segítségével történő kiértékelést választottuk. Erre a célra az előbb ismertetett meghatározási módszert használjuk azzal az egyszerűsítéssel, hogy II. és IV. oldatot nem készítünk, hanem a III.-as extinkció értékeinek megfelelő glükóz értéket közvetlenül a glükóz standard extinkciós-görbéről olvashatjuk le. A százalékra történő átszámítás a fentiekkel megegyező.

Glükóz standard extinkciós-görbe elkészítéséhez a fent leírt II. sz. oldathoz hasonlóan 25, 50, 75, 100 és 125  $\mu\text{g}$  koncentrációs sorozatot készítettünk, majd ugyanúgy antronoztunk. Az így kapott extinkciós értékek adják a standard görbét. Három párhuzamos bemérés átlagából kaptuk azt a standard-görbét (egyenest), amelyik a lineáris regressziós egyenlet képlete értelmében ( $Y_e = a + bX$ ) esetünkben  $Y_e = +0,019 + 0,0081X$  egyenlettel jellemezhető. (SVÁB [19]). A regressziós állandó („a”) = +0,019; regressziós egyenletes („b”) = 0,0081 Ext;  $X = \mu\text{g}$  glükóz (független változó);  $Y_e =$  extinkció (függő változó). A regressziós egyenlet szignifikáns eltérése ( $b$ )  $P = 5\%$ -ra:  $\pm 0,00028$  Ext.  $Y_e$  szignifikáns eltérése  $P = 5\%$ -on  $\pm 0,0017$  Ext. Ezek alapján a görbe megszerkesztése nélkül, csupán egyenletének felhasználásával kiszámíthatjuk bármely mért ( $Y_e$ ) extinkcióhoz tartozó ( $X$ ) értéket, az egyenletnek  $X$ -re történő rendezésével. Pl. mért extinkció  $Y_e = 0,227$ ;  $a = +0,019$ ;  $b = 0,0081$ .

$$X = \frac{Y_e - a}{b} = \frac{0,227 - 0,019}{0,0081} = 25,7 \mu\text{g}$$

A %-os értékek kiszámítására a hígítások figyelembevételével a korábbiakkal azonosan járunk el.

Hogy a két módon kapott érték nem teljesen azonos az (26,5  $\mu\text{g}$  és 27,7  $\mu\text{g}$ ) abból adódik, hogy a Clegg-féle módszernél tulajdonképpen ideális standard görbére vonatkoztatva számolunk (origon áthaladó  $45^\circ$ -os egyenes) az utóbbi esetben pedig egy olyan tényleges méréseken alapuló egyenesre, melyet a hibafaktorok figyelembevételével szerkesztettük. Véleményünk szerint, ez utóbbi számítás a reális értékeket jobban megközelíti. Az így adódó különbség azonban, amint azt az alábbiakban látni fogjuk, a módszer szórásán belül van. Pl. cukor esetében 4,24% ill. 4,11%.

A meghatározás pontosságát vagyis a módszer szórását  $80 \times 2$  párhuzamos mérés alapján határoztuk meg. Ilyen nagyszámú adatból, képlet (1) alapján a módszer elméleti szórását ( $\sigma$ ) 95%-os statisztikus biztonsággal ismertnek tekinthetjük, és számításainknál a sok adatra érvényes egyenleteket használhatjuk. (SZEPESVÁRY és SVEHLA [20].)

A módszer elméleti szórása ( $\sigma$ ), amely mind a mintavétel, mind a módszer hibáját kifejezi, 1–12% cukor- és keményítőtartalom esetében, cukor meghatározás esetében  $\pm 0,18$  súly % glükóz, keményítőtartalom esetében  $\pm 0,17$  súly % glükóz.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{2n}} \quad (1)$$

Tekintettel arra, hogy igen érzékeny mikromódszerről van szó, különös figyelemmel kell lenni a pontos munka mellett a felhasznált eszközök és anyagok tisztaságára.

### Összefoglalás

Szőlővessző szénhidrát tartalmának meghatározására (keményítő és cukor) összehasonlító vizsgálatokat végeztünk az irodalomból eddig ismert meghatározási módszerekkel. (BERTRAND [21] HAGEDORN és JENSEN, POPOFF [17], PERLUSZ és MOLNÁR [16] és CLEGG [3]). CLEGG antrons módszerének módosításával érzékeny és pontos eljárást dolgoztunk ki, mely szőlővessző minták sorozatvizsgálatára igen alkalmas. Előnye, hogy a korábbi módszerek-nél lényegesen gyorsabb és kevésbé munkaigényes. A módszer elméleti szórása cukor meghatározás esetében  $\sigma = \pm 0,18$  súly %, keményítőnél  $\sigma = \pm 0,17$  súly % glükóz értékben. Az eljárás lényege, hogy a *golyósmalomban* (Bloch — Rosetti) *homogenizált* mintából először a cukrokat 80%-os forró etilalkohollal, majd a keményítőt 52%-os perklórsavval oldjuk ki. A kivonatokat megfelelő hígítás után antronnal reagáltatjuk, és a színekifejlődés után „S 61”-es szűrővel fotometráljuk. A számításokat vagy CLEGG [3] szerint, vagy a standard-görbe lineáris regressziós egyenlete alapján végezzük.

*Érkezett: 1960. augusztus 15.*

### I r o d a l o m

- [1] AFRIKJAN, B. L., MARUTJAN, SZ. A. & SZAARKJAN, R. G.: O formah zapasznüh uglevodov vinogradnoj lozü. Dokl. AN. SSSR. **96**. 1195—1196. 1954.
- [2] BERNSTEIN, Z. & KLEIN, S.: Starch and Sugar in Canes of Summer Pruned Vitis vinifera Plants. J. Exp. Bot. **8**. 87—95. 1957.
- [3] CLEGG, K. M.: The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. J. Sci. Food Agric. **16**. 40—44. 1956.
- [4] DREYWOOD, R.: Qualitative Test for Carbohydrate Material. Ind. Eng. Chem. Anal. **18**. 499. 1946.
- [5] FÉLFÖLDY, L. & F. KALKÓ, Zs.: Cellulóz-bontás mértéke a Balaton különböző biotopjaiban és annak mérése anthron reagenssel. Ann. Biol. Tihany. **25**. 209—215. 1958.
- [6] FÖLDES, J.: Összehasonlító vizsgálatok anthron reagenssel polysaccharidák meghatározására és jellemzésére. Kísérletes Orvostudomány. **II**. 1—5. 1959.
- [7] KOZMA, P.: Csonkázási kísérlet homoki gyalogművelésű kadarkán. Agrártud. Egyet. Kert- és Szőlőgazd. Tud. Kar. Évkönyv. 51—113. 1952.
- [8] KÖVESSY, F.: Recherches biologiques sur l'aotement des sarments de la vigne. Rev. Gén. Bot. **13**. 193. 1901.
- [9] MÁRKUS, LNÉ.: Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel. I. Agrokémia és Talajtan. **3**. 227—234. 1954.
- [10] MÁRKUS, LNÉ.: Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel II. Cellulózaktivitás mérése talajban és trágyában. Agrokémia és Talajtan. **4**. 207—216. 1955.
- [11] NIKITIN, N. I.: Hemicellulosen und Polyuronide. Die Chemie des Holzes. 145. Akad. Verl. Berlin. 1955.
- [12] OSZTROVSKYKYNÉ, NÉMETH, Á.: Vesszőérés, keményítő tartalom s a termőrügyek fejlődése. Ampelologiai Int. Évkönyv. **8**. 97—106. 1921—25.



- [13] PAECH, K. & TRACEY, M. V.: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. II. 155 Springer. Berlin. 1955.
- [14] PALOHEIMO, L. & PALOHEIMO, I.: Beiträge zur Jodkolorimetrie der Stärke nach der Methode Paloheimo. *Biochem. Z.* **238**. 391—400. 1931.
- [15] PALOHEIMO, L. & ANTILA, I.: Über die Anwendung des Pulfrich-Photometers bei jodkolorimetrischen Stärkebestimmungen. *Biochem. Z.* **238**. 401—407. 1931.
- [16] PERLUSZ, T. & MOLNÁR, J.: *Szénhidrátok. Dohánykémiai Gyakorlatok I.* 39—50. Élelmiszeripari Kiadó. Budapest. 1952.
- [17] POPOFF, J. D.: Zuckerbestimmung in Pflanzensubstanzen. *Bodenkunde PflErnähr.* **31**. 245—47. 1943.
- [18] STOEY, K. D.: Fiziologicseszkie osnovni prevrasenija uglevodov v vinogradnom rasztenii. Godisn. na Szofiyszkija Univ. Agron. Fak. **26**. 545—621. 1947—48.
- [19] SVÁB, J.: Szélsőséges adatok kizárása kísérleti eredmények értékeléséből. *Agrokémia és Talajtan.* **9**. 145—153. 1960.
- [20] SZEPESVÁRY, P. & SVEHLA, GY.: Matematikai statisztikai módszerek alkalmazása a kémiában. I. Magyar Kém. Lapja. **15**. 11—19. 1960.
- [21] VUK, M. & SÁNDOR, Z.: A liszt keményítőértékének meghatározása. *Élelmiszerkémia.* 329. Polinszky. Budapest. 1943.
- [22] WINKLER, A. J.: Some factors influencing the rooting of vine cuttings. *Hilgardia* **2**. 329—349. 1927.
- [23] WINKLER, A. J.: The effect of dormant pruning on the carbohydrate metabolism of *Vitis vinifera*. *Hilgardia* **4**. 153—173. 1929.
- [24] WINKLER, A. J. & WILLIAMS, W. O.: Carbohydrate metabolism of *Vitis vinifera*: hemicellulose. *Plant Physiol.* **13**. 381—390. 1938.
- [25] WINKLER, A. J. & WILLIAMS, W. O.: Starch and sugars of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* **20**. 412—432. 1945.
- [26] YEMM, E. W. & WILLIS, A. J.: The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochem. J.* **57**. 508—514. 1954.
- [27] ZIMMERMAN, J.: Sprosshistologie und Holzreife bei der Rebe. *Mitteilungen Ser. A. Klosterneuburg.* **4**. 101—119. 1954.

# СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ И РАЗРАБОТКА АНТРОПНОГО МЕТОДА ДЛЯ МАССОВЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ САХАРА И КРАХМАЛА В ЛОЗАХ ВИНОГРАДНОГО КУСТА

М. Панцел и И. Эйферт

Опытная лаборатория виноградарства Совхоза Балатонбоглар (Венгрия)

## Резюме

Основой успешного размножения винограда, а также создания долголетнего лозного куста является «зрелая лоза». При этом лоза имеет различные стадии, для которых характерны внешние и внутренние физиологические признаки. Одним из внутренних признаков является накопление продуктов обмена веществ. Среди них в первую очередь нас интересует количественное соотношение углеводов, так как при выращивании посадочного материала винограда, развитие новых органов и их жизнеспособность тесно связана с ними.

Этим вопросом занимались и раньше, но среди методических работ мы не встретили серийного метода, который бы давал возможность быстро, точно и просто определить углеводы в виноградной лозе.

Разработка такого метода является целью нашей работы.

Для оценки и сравнения провели определение сахара и крахмала четырьмя различными методами.

Сущность первого метода заключается в соляно-кислом гидролизе крахмала с последующим определением сахара и крахмала титрованием по методу Бертраанда. Бернштейн [2] и Вук—Шандор [21]. По второму методу гидролиз крахмала производится диастазой, но предварительно сахар отделяют. Сахара и гидролизированный крахмал определялся методом Hagedorn—Jansen в модификации Попова [17].

По третьему методу расщепление крахмала проводится раствором солянокислого спирта, растворение горячей водой и гидролизация слюной производится по методу Перлуса и Молнара [16]. Сахара определяются методом Бертранда, а гидролизированный крахмал — цериметрическим титрованием. Четвертый метод, который Clegg [3] применял для гороха и зерновых, основан на применении антрона. Для виноградной лозы этот метод модифицировали: перед определением сахара и крахмала, соединения, препятствующие протеканию реакции (полифенолы и белки), были осаждены ацетатом свинца. Определение по этому методу сахара и крахмала и выражение их в значениях глюкозы очень простое.

Результаты четырех методов приводятся в первой таблице.

Высокая редуцирующая способность, при первом методе, обусловлена не только сахаром и крахмалом, но и гемицеллюлозой.

Так как второй метод очень длительный, мы для сравнения сделали определения только простых сахаров и крахмала.

Определение сахаров и крахмала по третьему методу можно использовать для контроля анализов, проводимых по четвертому методу. Данные относятся к сухому веществу.

Для анализов одного и того же исходного раствора, мы в растворе, полученном 2-ым методом (обозначили «а»), исследовали исходный сахар различными методами Hagedorn—Jansen, Bertrand и антроном.

Полученные данные показаны в таблице 2, где имеются данные 3—3 параллельных определений. Подобные определения сделали у исходного раствора крахмала, полученного по 3-му методу.

Определили содержание крахмала цериметрическим методом, антроном и методом Paloheimo [14, 15].

Сопоставляя данные различных методов мы решили в своих работах пользоваться антронным методом. Высушенную при 65° С виноградную лозу мелко растирали, потому что только в этом случае содержащийся в ней сахар и крахмал могут растворяться в спирте и хлорной кислоте. Поэтому после грубого размельчения, сделанного мельницей Medicago, проводят более мелкое измельчение мельницей Schildknecht (Zürich), и просеивание через сито в 0,5 мм. Из, таким образом приготовленного, сухого материала 0,5 гр помещали в шаровую мельницу Bloch—Rosetti и в ней хорошо перемешивали с морским песком и этиловым спиртом. Этот однородный материал дистиллированной водой переносили в полиэтиленовую трубку центрифуги, в которой растворяли сахар в 70% горячем этиловом спирте, а крахмал в 52% растворе смеси хлорной кислоты и воды, а затем центрифугированием количественно извлекали их.

Из исходного раствора сахара проводили осаждение ацетатом свинца. Избыток иона свинца нейтрализовали двойным гидрофосфатом натрия. Нейтрализацией осаждаемого вещества концентрация спирта, используемого для выделения сахара, разбавляется, так что он не мешает при антронном методе. Поэтому выпаривание под вакуумом по методу Clegg [3] можно не делать и тем самым сократить время анализа.

Определение содержания сахара и крахмала происходит следующим образом: в колбу из боро-силикатного стекла с притертой пробкой, помещаем 1—1 мл исходного раствора и прибавляем к нему 1—1 мл дистиллированной воды. После этого проводится охлаждение на льду в то же время добавляется по каплям 4—4 мл 0,2% антрона, растворенного в 95%-ой серной кислоте. На кипящей бане кипятим в течение 10 минут, затем 15 минут охлаждаем в проточной воде. Интенсивность образовавшейся желтой окраски измеряем фотометром Пульфрихта, со светофильтром «S—61».

Каждый исходный раствор антронизировали в 3-х повторностях. Пересчеты в проценты можно сделать по Clegg [3] или на основе уравнения линейной регрессивной кривой стандарта глюкозы.

Теоретическое колебание ( $\sigma$ ) результатов этого метода в случае определения соединений сахара  $\pm 18$  вес - % - глюкоза, а у крахмала  $\pm 0,17$  вес - % - глюкоза.

Табл. 1. Данные анализов сравнения четырех методов. (1) Обозначение параллельных образцов; (2) Номер метода; (3) Простые сахара; (4) Тростниковый сахар; (5) Общий сахар; (6) Крахмал; (7) Общая восстановительная способность после гидролиза.

Табл. 2. Содержание простого сахара в %; (1) Обозначение образца; (2) Метод Hagedorn—Jensen (3) Метод Bertrand (4) Антронный метод.

Табл. 3. Содержание крахмала в процентах. (1) Обозначение параллельных образцов; (2) Цериметрическое титрование; (3) Антронный метод; (4) Метод Paloheimo.



## Comparison of Different Analytical Methods in the Serial Analysis of the Sugar- and Starch Contents of Vine Shoots and the Application for this Purpose of the Anthrone Method

M. PÁNCZÉL and J. EIFERT

Laboratory for Viticulture, State Farm, Balatonboglár (Hungary)

### Summary

"Mature shoot" is the prerequisite of successful vine propagation, and especially of the longevity of vine plants. Different stages can be distinguished in the maturation process, characterized by external as well as by inner characteristics and physiological processes. It is suggested that the quality of the reserve food material might be one of the inner characteristics. We have taken special interest in the quantitative composition of the carbohydrate fraction, because there exists a strong correlation between carbohydrate content and vegetative development of vine shoots, both after and before propagation.

The question has already been studied by other authors. Nevertheless, their reports did not contain an analytical method that would suit our purposes, therefore we have undertaken the work of elaborating a fast, sensitive and well reproducible method for the serial analysis of the carbonhydrates of vine shoots.

Four widely used methods were compared in the above respects at the first stage of our investigations. A critical evaluation of the results obtained is summarized as follows.

The essential feature of the first method BERNSTEIN [2], VUK and SÁNDOR [21] is the hydrolysis of starch with hydrochloric acid whereafter starch is determined together with sugars by the titrimetric method of Bertrand.

According to the second method sugars are separated before starch is hydrolyzed by diastase. Sugars and the starch hydrolysate was determined in these experiments by the Hagedorn-Jensen method as modified by POPOFF [17].

The third procedure adapted from PERLUSZ and MOLNÁR [16] consists in liberating the starch with ethanol-hydrochloric acid followed by extraction with hot water, and hydrolysis of the extract with saliva. Sugars are estimated by the method of Bertrand, while the starch hydrolyzate is assayed with cerimetric titration.

The fourth method studied was based on the procedure of CLEGG [3] as applied to the study of pea and cereal carbonhydrates. This was modified by precipitating the disturbing materials with lead acetate (proteins, polyphenols) before sugar and starch determinations were made. This last method was found to yield well-reproducible data in glucose equivalents as to the sugar and starch content of vine shoots.

Table 1. shows the data on which the comparison of the above four methods is based.

Method 1. yielded high values for total reducing sugars. It is suggested that this is due to the presence of disturbing hemicelluloses.

Method 2. was time-consuming, and was chosen only as a reliable reference method for the distinction of starch and simple sugars.

Method 3. yielded reliable estimations of total sugar and starch contents and was used to control the respective values obtained by method 4.

Data of Table 1. are expressed as per cents of the dry matter contents.

In one of the experiments sugar determinations were made by different methods in aliquots of the same stock solution. The latter was obtained by method 2. (solution "a"; 2/a), while the analytical methods compared were those of Hagedorn and Jensen, Bertrand's procedure, and the anthrone method. The average values of three parallel determinations are found in Table 2.

Similar studies were made with the starch stock solution obtained by method 3. Parallel determinations of the starch content of the latter were made by cerimetric titration, by the anthrone method, and by the colorimetric iodine method of PALOHEIMO [14, 15]. Average values based on 3—3 parallel determinations are shown in Table 3.

The above comparisons resulted in the choice for further studies of the anthrone method. Care was taken in the pulverization of shoots dried at 65° C, because this is the prerequisite of a quantitative extraction of its sugar and starch contents by ethanol



and perchloric acid. Two successive grindings were usually applied, the first one with a Medicago beating mill, followed by a second grinding with a Schiltknecht (Zürich) fine beating mill. The final powder had to pass a sieve of 0,5 mm. The air-dry material thus prepared was homogenized in 0,5 g aliquots in a Bloch—Rosetti ball mill with quartz sand and ethanol. The homogenate was washed with distilled water into centrifuge tubes. Sugars were extracted first with 80% hot ethanol, followed by the extraction of starch with a mixture of 52% perchloric acid and water. Both fractions were obtained by repeated centrifugation.

Sugar stock solutions were purified by precipitation with lead acetate. Surplus lead was neutralized with  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . The alcohol concentration in the solution was so much lowered through the neutralization process, that it was no longer disturbing in the anthrone reaction. Thus we could omit the time-consuming vacuum evaporation applied by CLEGG [3].

Sugar- and starch-determinations were made in the following way: To 1 ml of the stock solution 1 ml of distilled water was added in boron silicate ground-stoppered test tubes. Four ml anthrone reagent (0,2% anthrone in 95% sulphuric acid) was added to the tubes cooled with icewater. The mixture was heated for 10 minutes on a boiling water bath, and cooled for 15 minutes by running tap water. The colour intensity was measured in a Pulfrich photometer with filter "S 61". Intensity of the green colouration was stable for at least 1 hour. The anthrone reaction was repeated with 3 aliquots of the stock solutions.

Glucose equivalents were computed either with the method used by CLEGG [3] (% contents computed by proportion), or with the equation of the linear regression of the standard glucose curve.

In per cent glucose equivalents, standard error ( $\delta$ ) in these determinations was  $\pm 0,18$  for starch contents, and  $\pm 0,17$  sugar contents.

*Table 1.* Determination of sugar and starch contents with different analytical methods. (1) Sample number. (2) Analytical method. (3) Simple sugars. (4) Sacharose. (5) Total sugar. (6) Starch. (7) Total reducing capacity after hydrolysis.

*Table 2.* Simple sugar content of solution 2/a, per cent. (1) Sample number. (2) According to the method of Hagedorn and Jensen. (3) According to Bertrand's method. (4) According to the anthrone procedure.

*Table 3.* Starch content of stock solution "3", per cent. (1) Sample number. (2) Cerimetric titration. (3) Anthrone method. (4) Colorimetric iodine method.